

学生海外調査研究	
アクアポリン 8 ノックダウン脂肪細胞における電子伝達系複合体 IV の機能測定	
氏名 伊香賀 玲奈	理学 専攻
期間	2013 年 8 月 6 日 ~ 2013 年 8 月 29 日
場所	ロンドン (イギリス)
施設	University College London

派遣報告

1. 海外調査研究の目的と必要性

1.1 研究背景

脂肪細胞のサイトカイン分泌とミトコンドリア機能異常の関係を示唆する結果が報告され[1], 脂肪細胞におけるミトコンドリアの機能が注目されている。ミトコンドリアは生命の様々な活動に必要なエネルギーを産生し、副産物として多量の水を自らのマトリクスへ産出する。ミトコンドリアを囲う二重の膜のうち内膜は透過性が低く、生成した多量の水を排出するなんらかのしくみが存在すると考えられる。AQP8は水チャネルアクアポリンの一つである。ほとんどのアクアポリンが細胞膜に存在する中、AQP8はミトコンドリア内膜での局在がいくつかの組織・細胞で確認された興味深いタンパク質である[2,3]。

申請者は、これまで脂肪細胞の研究に広く用いられている 3T3-L1 脂肪細胞を用いて、AQP8 が発現していること、AQP8 の細胞内局在がミトコンドリアであることを初めて明らかにし、さらに、AQP8 の発現抑制はミトコンドリア膜電位の過分極、FAD/FADH 比の低下を引き起こすことを蛍光顕微鏡によるイメージングで明らかにしてきた。この結果は AQP8 の抑制はミトコンドリア機能を低下させることを示している。研究の次の段階として、このミトコンドリア機能低下がミトコンドリア内からの水排出異常によるものであることを証明する必要がある。

1.2 本研究の目的

AQP8の発現を抑制した細胞のミトコンドリアで水排出異常が起こっていることを証明する方法として、以下のような測定が考えられる。

(1) 水生成反応を触媒する複合体IVおよびATP合成酵素の活性測定：ミトコンドリア内からの水排出が滞ると、多量の水を生成する複合体IVおよびATP合成反応は抑制されると考えられる。

(2) ミトコンドリアの体積測定：水排出の異常は、ミトコンドリアの体積を増加させる。

本海外調査研究では、複合体IVにおける酸素消費量を測定することを主目的とし、また、帰国後に行うミトコンドリア体積変化の実験手法を学ぶことを第二の目的としている。

1.3 研究先の選定

Oxygraph-2kは酸素消費量をリアルタイムでかつ高感度に測定できるため、電子伝達系異常における各複合体の活性測定に極めて有能な装置(図1)であるが、所有する研究室はまだ少ない。訪問先の Michael Duchen博士は、ミトコンドリア研究ならびにOxygraph-2k・蛍光顕微鏡などを用いたリアルタイムイメージングの権威であり、生物系の一流国際誌である Science などにも多くの論文を発表している。更に当研究室は各国のミトコンドリアの研究者が集まっており、高いレベルのディスカッションが日々行われている。

Oxygraph-2kによる酸素消費量測定を行うことができること、ミトコンドリア研究およびリアルタイムイメージングに関する世界のレベルの技術および知識が得られ、さらに昨年3か月間の滞在経験があることから、短期間でも十分な研究成果をあげられると期待できるので、訪問先として選定した。

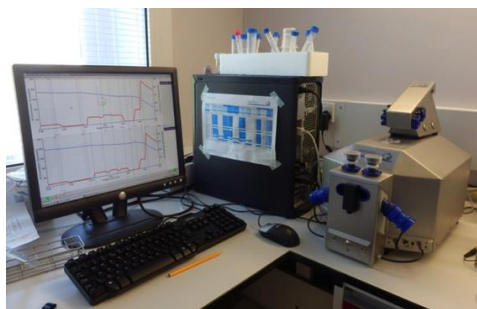


図 1. The Oxygraph-2k(OROBOROS Instruments)

1.4 本研究の位置づけと意義

測定脂肪細胞は単なるエネルギーの貯蔵器官であると長らく考えられてきたが、現在では自ら様々なサイトカインを分泌する内分泌器官と認知されている。正常な機能を失うとより多くのサイトカインが分泌され、慢性的な炎症が引き起こされる。この慢性炎症は肥満、糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病に共通する基盤病態として知られてきている。加えて、脂肪細胞のミトコンドリア機能が肥満や2型糖尿病の潜在的治療という視点から近年見直されてきた[4]。一方で、ミトコンドリアの機能制御に関する研究は近年飛躍的に発展し、ミトコンドリア機能異常を原因とする疾病についてもその発症機序の解明が進んできたが、水の排出機構とミトコンドリア機能との関係に着目した研究はまだ無い。

脂肪細胞において、AQP8がミトコンドリアの水輸送機構にどのように関わり、さらにその発現抑制がミトコンドリア機能にどのような影響を与えるかを調べることは、脂肪細胞の病態変化とミトコンドリアとの関係を明らかにするだけでなく、ミトコンドリア機能低下を原因とする様々な疾患の発症メカニズムに対して新たな知見を提供できると考えている。

2. 本研究の成果

University College London の Mitochondrial cell biology 研究室に滞在し実験を行った。また当プログラムで計画している実験の方針についての議論のみならず、申請者のこれまでの研究ならびに帰国後に予定している実験についても多くの方々とディスカッションする機会を得ることができた。

2.1 実験の成果

2.1.1 実験の概要

ミトコンドリア電子伝達系は図2に示すように、4つの複合体から構成されている。NADHおよびFA DHから複合体Iと複合体IIに供給された電子はCoenzyme Q、複合体III、Cytochrome Cを経て、最終的に複合体IVに伝達されて酸素から水を生成する反応に使われる。OROBOROS Oxygraph-2kは、測定系中の酸素量の変化をリアルタイムでモニターすることにより、複合体IVで単位時間あたりに消費される酸素量すなわち電子伝達系の反応速度を測定することができる装置である。この装置を用いてアクアポリン8ノックダウン細胞の電子伝達系全体の活性および複合体IVの活性の測定を行った。

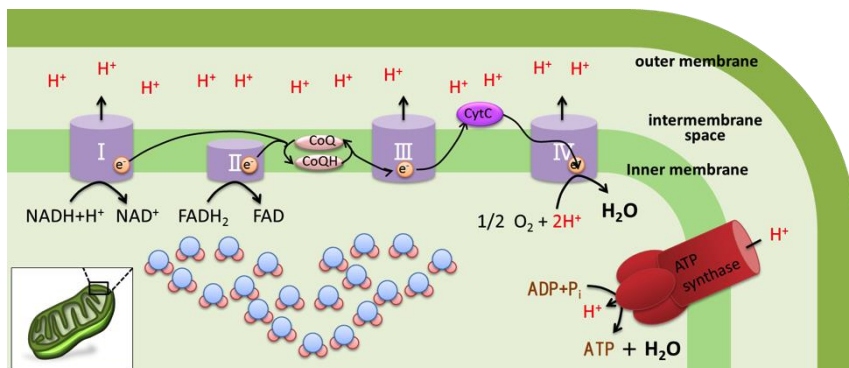


図 2. ミトコンドリア電子伝達系(模式図)

2.1.2 測定方法について

細胞懸濁液を常に均一に懸濁された状態下に保ちながら以下の1~4の試薬を段階的に添加し、酸素量の変化をモニターした。各試薬添加後の酸素量変化の微分値すなわち酸素消費速度を、電子伝達系の活性、および複合体IVの活性を表す値として、コントロール細胞と比較した。

1. Oligomycin

ミトコンドリアATP合成酵素の阻害剤。ATP合成酵素の阻害は電子伝達系を停止させる。この状態で消費される酸素は電子の漏れ出しに依存することから、この状態をLEAK respiratory stateとした。

2. FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone)

ミトコンドリア脱共役剤である。ATP合成反応は、電子伝達系複合体によって形成されたプロトン濃度勾配の解消と $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ の反応との共役反応であるが、FCCPはイオノフォアの一つであり、ATP合成を伴わずにプロトン濃度勾配を解消する。プロトン濃度勾配を失ったミトコンドリアは、プロトンを補うために電子伝達系の活性を高めようとする。つまりFCCPの添加により最大限に引き上げられた酸素消費量は、電子伝達系の最大能力値 (ETS respiratory state) と定義できる。

3. Antimycin A

電子伝達系複合体IIIの阻害剤。Antimycinを添加すると電子の流れは複合体IIIで停止する。そのため複合体IVにも電子は流れず酸素の消費が行われない。この状態を電子伝達系が機能しない状態 (non mitochondrial respiration(nmt)) として酸素消費量の最低値とした。

4. TMPD (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) / Ascorbate

ミトコンドリア電子伝達系複合体IVの活性を測定するために用いた。TMPDはCytochrome Cに直接電子を渡すことができるため、Antimycinの添加で電子の流れが停止した複合体IVに再び電子を渡すことで水生成部分の複合体IVの活性が測定できる。

2.1.3 結果及び考察

本節では得られた結果の一部を掲載する。当プログラムにて得られた結果を含めた内容を論文投稿する予定のため、全結果の記載を避けることをご了承いただきたい。

最終的には図3に示すようなデータを各細胞について9回得て平均を比較した。Control細胞はAQP8ノックダウン細胞に比べてRoutine(平常値)及びETS respirationレベルが低く、複合体IVの活性も低下していた。よってAQP8ノックダウン細胞では、ミトコンドリア内の水の蓄積が複合体IVの活性を低下させていると考えられた。

今後、ミトコンドリア体積や内部構造を観察することで、AQP8と水の流れの関係を他の角度からも検証する予定である。

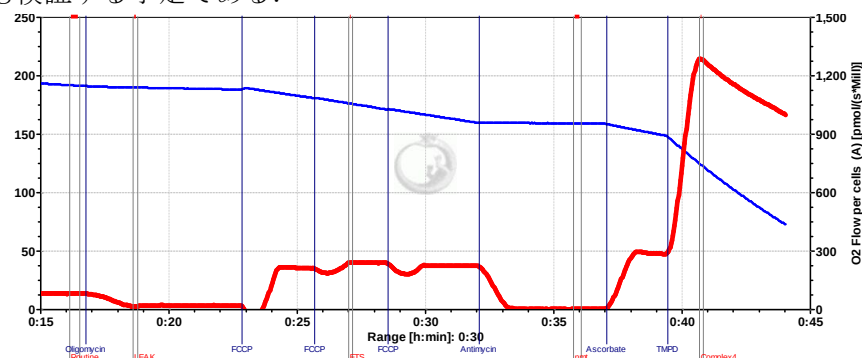


図3 Oxygraph-2kで得た結果 (例)

青線は測定系中の酸素量、赤線は酸素量の微分値 (変化量)、各試薬を添加した時点は青文字で示した。

電子伝達系の活性 (Routine, LEAK, ETS) および複合体IVの活性を示す範囲を赤文字とその上部の枠で示した。

2.2 人的交流の成果

訪問期間中には、研究室内外で多数の研究者とのディスカッションを通して、多くの知識および研究視点を獲得することができたが、特に以下の方々との交流は、本海外調査研究での成果としてここに記したい。

Michael Duchen 博士

昨年度、Michael Duchen 博士のもとで研究を行った際、申請者のこれまでの研究内容についてディスカッションおよびアドバイスを頂いている。申請者がお茶の水女子大学博士後期課程に入学後行った研究結果について報告し、また今回のプログラムで計画している研究方針についてディスカッショ

ンを行った。

Vassilios Kotiadis 氏

Duchen Lab の PhD である Vassilios Kotiadis 氏は Oxygraph-2k を用いて数多くの実験を行っている。Oxygraph-2k の使用方法や得られた結果についての解釈を教えていただいた。

Zhi Yao 氏

Gyorgy Szabadkai Lab の PhD である Zhi Yao 氏は細胞や組織のミトコンドリア単離とミトコンドリア機能測定に精通している。申請者のこれまでの研究についてディスカッションおよびアドバイスをいただいた。

Sam Ranasinghe 氏

研究先で所有している共焦点顕微鏡の技術者である Sam Ranasinghe 氏には、共焦点顕微鏡を使用するに当たり適切なミラーや波長の選択の方法や撮像するためのテクニックなどを教えていただいた。また申請者は帰国後に共焦点顕微鏡を用いてミトコンドリア形態変化を比較しようと考えており、その実験方法について具体的な構想を話し合った。

Juan Carlos Corona 氏

Duchen Lab の PhD である Juan Carlos Corona 氏は活性酸素の測定を主に行っている。申請者は日本にて活性酸素の測定を試みたが、細胞の性質から2種類の細胞の比較は困難であった。この研修期間中、活性酸素を標準化する方法や実験のテクニックなどを教えていただいた。

3.外部機関への公表

本プログラムの成果を含め来年度までには国際誌の論文投稿ができるよう準備を進めている。また全結果は学位論文の一部とする。得られた結果は以下の学会で報告する予定である。

- 伊香賀玲奈, Vassilios Kotiadis, Michael Duchen, 行方衣由紀, 田中光, 小川温子, 飯田-田中直子「Oxygraph-2k を用いた AQP8 ノックダウン細胞の酸素消費量の測定」第 86 回 日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日, 神奈川 (ポスター発表)
- Reina Ikaga, Vassilios Kotiadis, Michael Duchen, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka, Haruko Ogawa, Naoko Iida-Tanaka “Knockdown of aquaporin-8 in adipocytes induces mitochondrial functional decline.” The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, October 28 – November 1, 2013, Okinawa (Poster session)

4.謝辞

この度はお茶の水女子大学文部科学省特別経費「女性リーダーを創出する国際拠点の形成」プロジェクト「学生海外派遣」プログラムに採択していただき、ご支援していただきましたことを感謝申し上げます。本プロジェクトを遂行するに当たり研究留学を快く受けてくださいました Michael Duchen 教授に深く感謝いたします。また、ディスカッションや実験方法を教授いただきました Vassilios Kotiadis 氏, Sam Ranasinghe 氏, Zhi Yao 氏, Juan Carlos Corona 氏をはじめ、研究室に温かく迎え入れてくれた Duchen Lab および Szabadkai Lab の皆様にも感謝の念が堪えません。また、今回の研修留学を応援してくださいました大妻女子大学の田中直子教授、ならびに本学指導教員の小川温子教授、にも深く感謝申し上げます。この経験をもとに自らの研究を更に発展させていきたいと思っています。

参考文献

- [1]Chen XH et al., TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocyte, *Mol Cell Endocrinol.* **328**(1-2):63-69 (2010)
- [2]Calamita G et al., The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water., *J Biol Chem.* **280**(17):17149-17153 (2005)
- [3]La Porta CA et al., Adult murine CNS stem cells express aquaporin channels, *Biol Cell.* **98**(2):89-94. (2006)
- Vernochet C et al., Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* **16**(6):765-776 (2012)

指導教員によるコメント

まず指導教員として、伊香賀玲奈さんを学生海外調査研究プログラムに採択して下さい、英国への派遣をご支援くださいましたことにお礼を申し上げます。

今回、滞在した **Duchen** 教授の研究室は、伊香賀さんの修士時代の指導教員であった田中直子先生（大妻女子大学教授）が留学しておられたラボです。昨年、伊香賀さんが一度訪問した折には田中先生の留学期間中でしたのでとても心強かった訳ですが、今回は伊香賀さんにとって初めての、単独の研究留学でした。報告書に書かれていますように、3 週間という短期間にもかかわらず、重要な研究成果を上げることができ、また多くの方との議論によって今後の研究への展望が大きく開けたようです。単に装置の借用に留まらず、**Duchen** 博士ならびに関連するさまざまな研究者と交流できましたので、今後の伊香賀さんの研究と国際的な活躍に役立つ経験を積むことができたと考えられます。今回の経験を研究面でも精神面でも大切に発展させ、国際レベルで研究推進していくことを期待したいと思います。

（大学院 自然・応用科学系 小川温子）

Measurement of mitochondrial complex IV activity in aquaporin-8 knockdown adipocytes.

Reina Ikaga

Aquaporin-8(AQP8) was identified as a water channel in pancreas and liver. However, its function remains mostly unclear. Recently, we have found that it was expressed in mitochondria of 3T3-L1 adipocytes, and that AQP8-knocked down(shAQP8) cells showed hyperpolarized mitochondrial membrane potentials and higher FADH/FAD ratios than control cells, that is, low mitochondrial activities. In this study, we investigated the role of AQP8 on mitochondrial respiration by repressing AQP8 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Oxygen consumption rates were analyzed by Oxygraph-2k. The routine respiration and ComplexIV activities of shAQP8 cells were lower than in controls, leading us to a hypothesis that decline of mitochondrial water flux in shAQP8 cells may weaken the water-forming reaction at ComplexIV.